



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/558, 33/72, 33/58</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/34815</b> <b>(43) Date de publication internationale: 21 décembre 1995 (21.12.95)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR95/00776 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 13 juin 1995 (13.06.95) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 94/07193 13 juin 1994 (13.06.94) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> GKS TECHNOLOGIES [FR/FR]; 9, quai Moncoussu, Hôpital Hôtel-Dieu, F-44000 Nantes (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> GOUMARD, Philippe [FR/FR]; 62, rue Jean-Vaquier, F-93160 Noisy-le-Grand (FR). KADOUCHE, Jean [FR/FR]; 62, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR). SAMAKE, Hamidou [FR/FR]; 19, rue des Balkans, F-75020 Paris (FR). <b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> DEVICE FOR RAPID DAGNOSIS OF ANY GLYCATED MOLECULE AND PROCESS FOR IMPLEMENTING SUCH DEVICE <b>(54) Titre:</b> DISPOSITIF DE DIAGNOSTIC RAPIDE DE TOUTE MOLECULE GLYQUEE ET PROCEDE DE MISE EN ŒUVRE <b>(57) Abstract</b> <p>Device for the detection and determination of a glycated or glycosylated protein present in a sample, comprising a juxtaposition of a reservoir zone containing a glycated protein specific ligand, a selective absorption zone comprised of a different material, optionally a zone for controlling the good operation of the reaction and an absorbing medium which favours the liquid flow through said zones.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Dispositif pour la détection et la détermination de protéine glyquée ou glycosylée présentée dans un échantillon comprenant une juxtaposition d'une zone réservoir contenant un ligand spécifique de la protéine glyquée, une zone d'absorption sélective constituée d'un matériau différent, le cas échéant une zone de contrôle de bon fonctionnement de la réaction, et un moyen absorbant favorisant le flux de liquide à travers les zones précédentes.</p>		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**DISPOSITIF DE DIAGNOSTIC RAPIDE DE TOUTE MOLECULE**  
**GLYQUEE ET PROCEDE DE MISE EN OEUVRE**

La présente invention est relative à un test de diagnostic rapide de la présence dans un échantillon biologique d'une substance glyquée ou glycosylée quand celle-ci est présente simultanément avec la même molécule non glyquée ou non glycosylée ; cela est particulièrement indiqué dans le cadre du suivi de la glycémie chez les diabétiques.

Par substance glyquée ou protéine glyquée, on entend tout type de substance à laquelle est liée de quelque façon au moins une molécule de glucose seule ou en association avec d'autres molécules de sucre, la liaison étant de préférence de type covalant, non enzymatique, alors que le sucre ajouté par voie enzymatique sur une substance génère une molécule glycosylée, ou glycoprotéinée si la substance est une protéine.

Des exemples particuliers de substance glyquée peuvent être l'hémoglobine glyquée, l'albumine glyquée pour les premiers.

Le dispositif et le procédé pour le diagnostic rapide de la présente invention est particulièrement original en ce sens qu'il permet de discriminer dans un liquide biologique une glycoprotéine ou une protéine glyquée de la même protéine dépourvue de tout résidu de sucre.

**Etat de la technique de dosage de protéines glyquées**

Les numéros de références entre parenthèses renvoient à une liste de références en fin de la description.

Un cas particulièrement crucial où il est nécessaire de pouvoir doser des protéines glyquées dans

le sang est le cas du suivi de la glycémie chez les diabétiques ; aussi c'est ce type de dosage qui a permis de mettre au point les techniques les plus sophistiquées pour permettre de trouver un marqueur et de doser une protéine particulière qui est l'hémoglobine glyquée dans le cadre du suivi d'un traitement ; ce suivi peut être réalisé de différentes manières :

- le dosage du glucose,
- le dosage du fructosamine,
- le dosage des protéines glyquées, notamment l'albumine (1) ou l'hémoglobine (2).

L'analyse de la littérature révèle que le dosage des hémoglobines glyquées (3-6) (en particulier l'hémoglobine Alc), présente un intérêt considérable dans le suivi à long terme de l'évolution de la glycémie. En effet, des produits de réaction entre l'hémoglobine et le glucose se forment et sont accumulés dans les globules rouges durant toute leur existence (soit 120 jours). Les chercheurs ont montré qu'il existe une corrélation entre le taux d'hémoglobine glyquée circulante chez les diabétiques et leur concentration sanguine ou urinaire en glucose libre dans les semaines précédant l'examen (7). Il s'agit là d'une bonne méthode pour suivre l'évolution du diabète (2) et prévenir ses complications (8,9). Les patients diabétiques peuvent avoir des taux d'hémoglobine glyquée de 2 à 4 fois supérieurs à la moyenne, mais qui peuvent revenir à la normale dans le cas de thérapies adaptées.

La première méthode de dosage des "glycohémoglobines" a été mise au point par TRIVELLI en 1971 (10). Cette méthode utilise une colonne de chromatographie d'échange de cations de façon à fractionner l'hémoglobine en 4 fractions en fonction de la charge : hémoglobine Ao (HbAo), l'hémoglobine Ala

(HbAla), hémoglobine Alb (HbAlb) et hémoglobine Alc (HbAlc). L'hémoglobine Ao représente la majeure partie (environ 92 %), les hémoglobines Ala et Alb ne sont pas complètement séparées (2,5 %) et l'hémoglobine Alc représente 5,5 % de l'hémoglobine totale. Cette méthode qui n'est pas d'un usage facile en analyse de routine, a permis d'une part, d'établir des valeurs cliniques du dosage des hémoglobines glyquées, et d'autre part, de montrer des différences significatives dans les distributions des différentes hémoglobines chez les patients atteints de diabète et chez les patients normaux.

Au milieu des années 1970, des firmes commerciales (par exemple ISOLAB en 1977) ont développé et commercialisé des tests de dosage des hémoglobines glyquées (essentiellement HbAl) par échange d'ions. A cette époque, l'hémoglobine Alc était considérée comme étant la seule espèce glyquée de l'hémoglobine. L'hémoglobine Alc est une glycohémoglobine dont la séquence des aminoacides est identique à celle de l'hémoglobine. La seule différence qui l'en distingue est la fixation par voie non enzymatique (ou glycation) d'une molécule de glucose ou de glucose-6-phosphate sur le résidu valyl terminal de la chaîne (bêta) suivi par un réarrangement d'Amadori.

Une autre technique permet de quantifier l'hémoglobine Alc : il s'agit de l'isoélectrophorèse en gel d'agarose ou IEF (11-14) proposée par certaines firmes commerciales depuis le début des années 1980. Cette technique, bien que très performante, est très lourde à mettre en oeuvre et nécessite un matériel complexe et un personnel technique très qualifié.

En 1976, une technique de dosage utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA) a été décrite par FLÜCKIGER et WINTHERHALTER (15). Elle a été modifiée en 1979 (16,

17) et a révélé des applications intéressantes pour le dosage de nombreuses protéines glyquées (18, 19).

Par la suite, des systèmes HPLC utilisant des résines échangeuses d'ions pour séparer HbA1 et HbAlc ont été développés (20-22).

A la fin des années 1970, des travaux portant sur les hémoglobines glyquées mettent en évidence l'existence d'une fraction labile intermédiaire "glycosylable" de façon réversible et dont la concentration dépend du taux de glucose circulant (25-28). Les techniques de dosage par échange d'ions ne permettent pas de faire la distinction entre les hémoglobines glyquées labiles et stables. Il est donc nécessaire de prétraiter l'échantillon avant le dosage de façon à éliminer la fraction labile (29, 30). De plus, d'une part, ces techniques sont influencées par la température qui doit être impérativement contrôlée (31), et d'autre part, les variants de l'hémoglobine interfèrent et rendent l'interprétation des résultats difficile (32-34).

Au milieu des années 1980, avec l'avènement des anticorps monoclonaux, les chercheurs ont tenté de mettre au point des dosages de type ELISA (22-24). Aucun de ces tests n'a pu être commercialisé, ni même utilisé dans des laboratoires de recherche. La difficulté technologique réside dans le fait que les anticorps monoclonaux mis en oeuvre doivent être très spécifiques de l'hémoglobine glyquée et ne doivent pas reconnaître l'hémoglobine normale.

La chromatographie d'affinité est la méthode de dosage de l'hémoglobine glyquée la plus récente (35, 36). Cette méthode est basée sur la capacité de l'acide boronique à former un complexe avec les groupes cis-diol des sucres en particulier du fructose et du glucose (35). L'acide boronique (acide aminophenylboronique) est couplé à une matrice de

chromatographie adaptée permettant de lier les hémoglobines glyquées. Les espèces glyquées liées sont éluées avec du sorbitol et quantifiées en spectrophotométrie (35-42). Cette technique est moins sensible aux variations de température et de pH que les techniques d'échange d'ions. Elle n'est pas influencée par la présence d'hémoglobine A1, F, S, C, E ou carbamylée.

Actuellement, trois méthodes peuvent être utilisées en routine : chromatographie d'échange d'ions, électrophorèse en gel d'agarose et chromatographie d'affinité (43). Toutes ces méthodes sont corrélées entre elles et ont une bonne précision, mais la calibration et les procédures de contrôle de qualité sont difficilement standardisables.

En revanche, la technique dite au boronate (43) qui semble présenter le meilleur potentiel présente malgré tout des inconvénients qui sont un appareillage lourd et complexe, coût élevé de l'analyse, nécessité d'utiliser des personnels de haut niveau technique.

#### Etat de la technique sur les tests de diagnostic rapide

Il existe de nombreux tests de diagnostic rapide utilisant le principe de la chromatographie allié à celui de la constitution de paires d'affinité et de révélation par tout moyen simple et direct, notamment colorimétrique, et mettant en oeuvre plus particulièrement des réactions de type antigène-anticorps soit par formation de sandwich, soit par compétition ; à titre d'exemple, on pourra citer : le brevet EP 306 772 au nom de ABBOTT ; ce brevet décrit un dispositif de test rapide de type chromatographique qui fonctionne par capillarité, qui possède une zone dans laquelle est fixée un ligand de la substance à analyser, ainsi qu'un matériau de fixation spécifique marqué permettant la révélation de

la réaction des deux parties de la paire d'affinité l'une avec l'autre. Le support de cette réaction est constitué de matériaux déjà utilisés pour la chromatographie, de type fibreux non tissé ou encore des substrats microporeux ou microgranulés.

Ce type de procédé ne met en oeuvre qu'un seul support et permet la réaction de test de type sandwich ou par compétition ; il nécessite en outre un traitement de la bande de support postérieure à la réaction et destiné à bloquer les sites de fixation éventuellement en excès sur ledit support ; enfin aucun type de contrôle interne de bon fonctionnement de la réaction n'y est prévu, ce qui peut rendre parfois l'interprétation dudit test difficile.

La demande de brevet WO 91/12528 au nom de HYGEIA SCIENCES décrit un dispositif de diagnostic rapide comprenant un support solide sur lequel les substances constitutives de paires d'affinité migrent par capillarité. Des réactions de type sandwich ou compétition obtenues par réaction d'antigènes avec des anticorps sont ensuite susceptibles d'être bloquées par un système de capture de type avidine/biotine ; la deuxième partie d'une paire d'affinités devant réagir avec la substance à doser peut être marquée par une substance de type or colloïdal et par une substance capturable de type biotine. Cependant ce test de type immunologique antigène-anticorps ne permet pas de discriminer dans un liquide biologique le pourcentage pour une protéine donnée de celle qui pourrait être glycosylée ou glyquée par rapport à celles qui ne le sont pas. En outre, rien dans ce brevet ne permet non plus d'éliminer une éventuelle réaction due à des faux positifs et notamment en cas de réaction contre des anticorps d'espèce qui auraient servi comme révélateurs de la réaction. D'autres demandes de brevet ou brevets décrivent des tests rapides de type bandelette, la



totalité de ceux-ci étant basée sur des réactions de type antigène-anticorps. A titre d'exemple, on peut citer le brevet US 4 868 109, plus particulièrement appliqué à la sérologie, la demande de brevet WO 94/07141 qui est un double test dont une partie permet un contrôle et l'élimination des faux positifs, les demandes de brevet EP 291 194 et EP 560 411 décrivant un dispositif permettant le diagnostic rapide de la présence d'une substance dans un échantillon biologique, test immunologique faisant jouer également des réactions de type antigène-anticorps, la révélation étant réalisée par marque à l'or colloïdal.

Il en est de même des brevets EP 183 442,  
EP 286 371, EP 250 137, EP 207 152, EP 398 913,  
WO 94/07136, EP 174 247.

Aucun de ces tests dans aucun de leur mode de réalisation ne permet de discriminer clairement entre une protéine glyquée d'une protéine non glyquée lorsqu'elles sont présentes simultanément dans le liquide biologique à doser.

La figure 1a représente le dispositif dans son boîtier. La figure 1b représente une vue en coupe longitudinale de profil des différents éléments du dispositif comprenant le filtre, le réservoir, une première membrane de nitrocellulose, la membrane activée de capture, la deuxième membrane de nitrocellulose comprenant la zone témoin de bon fonctionnement, la zone buvard hygroscopique, le tout posé sur un support plastique de type "Mylar"<sup>R</sup>.

La figure 1c représente une vue en coupe longitudinale vue de face.

La figure 1d représente une coupe de la zone réservoir surmontée d'un filtre.

DESCRIPTION DE L'INVENTION :

L'invention concerne un procédé et un dispositif permettant le dosage rapide dans un échantillon d'une

substance glyquée ou glycosylée ; compte tenu de l'importance des protéines glyquées et en particulier de l'hémoglobine glyquée dans le suivi de certaines pathologies, il sera toujours plus particulièrement fait référence à cette application ; cependant, l'homme du métier saura adapter le procédé et le dispositif décrits ci-dessous à tout dosage de protéine glyquée ou glycosylée autre que l'hémoglobine glyquée.

Le procédé de détermination et de dosage de la quantité d'une substance glyquée ou glycosylée présente dans un échantillon comprend les étapes suivantes :

a) Appliquer ledit échantillon dans le réceptacle (16) d'un boîtier plastique, ledit réceptacle (16) étant superposé à une zone constituée le cas échéant d'un filtre (25), d'un réservoir (20) contenant un ligand (A) marqué, cette zone réservoir (20) étant fixée sur ou contigüe à une membrane (22) ayant la propriété de permettre la migration par capillarité des solutions contenant les molécules à doser et les paires d'affinités éventuellement formées dans la zone réservoir, et d'avoir une faible affinité pour les molécules biologiques.

b) Laisser l'échantillon migrer par capillarité à travers cette première zone jusqu'à une deuxième zone de capture constituée d'un support d'affinité (30) susceptible de retenir spécifiquement la molécule glyquée ou glycosylée recherchée,

c) Laisser l'échantillon migrer par capillarité vers une troisième zone garante (40) de bon fonctionnement de la réaction, ladite zone étant imprégnée d'un ligand spécifique (B) du premier ligand (A), au niveau d'une bande (42),

d) Lire la réponse par la présence ou l'absence d'une bande (31) au niveau d'une première fenêtre de lecture (17) laissant apparaître la zone (30) de la réaction et le bon fonctionnement de la réaction par

observation d'une bande (42) à travers une deuxième fenêtre de lecture (18),

e) Le flux de liquide entre le dépôt dans le réceptacle (16) et la lecture du résultat de la réaction étant réalisé par l'existence d'un moyen absorbant (50) possédant des propriétés hygrosopiques importantes et contigü à la membrane (40) ou au support d'affinité (30).

La première zone réactive et le réservoir sont avantageusement une seule et même zone, le réservoir contenant le ligand (A) de la première zone d'affinité, lequel y est présent alors sous une forme sèche réhydratable par l'application de l'échantillon dans lequel la protéine glyquée à doser est éventuellement présente.

Dans le procédé selon l'invention, la première zone réservoir (20) est constituée d'un matériau choisi pouvant jouer le rôle de contenant tel que la cellulose, les dérivés de la cellulose, un polyester de type nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples, et présentant avec ou sans traitement des propriétés de faible adsorption des molécules biologiques.

Dans cette première zone réactive, constituée du réservoir contenant le premier ligand (A) de la réaction, ledit ligand peut selon la substance glyquée recherchée, être notamment un anticorps, un glycane, une lectine, un substrat ou un inhibiteur enzymatique, une enzyme, un élément du couple haptoglobine-hémoglobine, ou toute molécule présentant une affinité particulière avec l'analyte à doser et susceptible de présenter une mobilité chromatographique après son couplage avec ladite molécule à doser.

Le procédé de l'invention implique que le ligand présent dans la première zone soit marqué par une substance dont les caractéristiques physico-chimiques permettent de révéler la présence de l'analyte recherchée par mesure d'une adsorption ou d'une modification d'une lumière à une ou plusieurs longueurs d'ondes situées dans l'ultra-violet, le visible ou l'infrarouge. Cela peut être une simple détection visuelle par un marquage par des particules colloïdales contenant un métal, par exemple de l'or, marquage réalisé par des techniques maintenant classiques et telles que décrites par exemple dans les brevets US 4.859.612, US 4.313.734 ou les demandes de brevet EP 291.194 ou EP 560.411, EP 398.913.

Le ligand selon le procédé de l'invention peut également être couplé à un marqueur organo-métallique permettant de révéler la présence du produit ayant réagi par détection infrarouge, la longueur d'ondes étant dépendante dudit marqueur utilisé.

Il apparaît clairement que ce type de composé permet, en utilisant différents types de marqueur organo-métallique dont la présence est révélabile à des longueurs d'ondes différentes en infrarouge, de procéder sur le même test à des détections de plusieurs analytes recherchées.

La deuxième zone réactive est une zone de capture. La capture signifie que le complexe molécule glyquée - ligand doit être spécifiquement retenu, à l'exclusion du complexe protéine non glyquée - ligand sachant que, dans le cas par exemple où la protéine à rechercher est l'hémoglobine glyquée, un anticorps monoclonal spécifique de l'hémoglobine ou l'haptoglobine pourra se lier aussi bien sur l'hémoglobine glyquée que sur l'hémoglobine non glyquée.

Dans le procédé de l'invention, la matrice de la deuxième zone réactive sera donc une matrice différente

de celle de la première zone réactive et sera modifiée de façon à présenter des propriétés d'adsorption sélective du couple ligand/protéine recherchée, discriminante vis à vis du même couple lorsque la protéine n'est pas glyquée.

Cette réactivité sélective de la deuxième zone réactive peut être obtenue soit par utilisation d'une membrane échangeuse d'ions, par exemple de cations qui elle sera capable spécifiquement de retenir des substances présentant une charge négative, cela peut être également une membrane de nitrocellulose activée notamment par de l'acide aminophénylboronique de telle façon à former un complexe avec les groupes cis-diol des sucres et en particulier du fructose, et en particulier du glucose présent en liaison covalente sur l'hémoglobine glyquée ; cette réactivité peut être également obtenue :

- par greffage de résidus ou de molécules ionisables tels les résidus R-NH<sub>2</sub>, R-OH, R-SH,
- par greffage de résidus possédant des propriétés hydrophobes, tels des chaînes polycarbonées, des résidus de type R-CH<sub>3</sub>, R-phényl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés chimiques réactives tels des résidus époxy, aldéhyde, carboxyl, halogényl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés biochimiques ou immunologiques appropriées tels un glycan, une lectine, un substrat ou inhibiteur enzymatique, un élément du couple avidine-biotine, un élément du couple hémoglobine-haptoglobine, ou toute molécule présentant une affinité particulière avec l'analyte à doser recherché.

Il apparaît clairement que ce qui est important dans le principe du procédé décrit ci-dessus, c'est qu'au niveau de la deuxième zone réactive, il y ait capture spécifique d'un complexe préalablement formé

entre la protéine recherchée et le ligand marqué présent dans la première zone réactive ; aussi il y a réversibilité des positions entre les première et deuxième zone du ligand marqué et de la substance ayant une affinité particulière pour les sucres portés par la substance recherchée. A titre d'exemple, toujours dans le cas de l'hémoglobine glyquée, si la première zone réactive comprend un anticorps anti-hémoglobine ou de l'haptoglobine, l'un ou l'autre marqué par de l'or colloïdal, la deuxième zone devra comprendre par exemple une résine d'échange d'ions susceptible d'absorber spécifiquement l'hémoglobine glyquée ou une matrice de chromatographie greffée avec une lectine, ou enfin une membrane activée au boronate ; si au contraire, la première zone réactive contient un ligand spécifique d'une protéine glyquée, par exemple une lectine, alors la deuxième zone réactive devra comprendre par exemple une substance telle un anticorps anti-hémoglobine couplé au support d'affinité qui pourra discriminer parmi toutes les protéines glyquées présentes dans l'échantillon l'hémoglobine glyquée.

La membrane de la deuxième zone peut être composée de tout matériau, seul ou en mélange, présentant les propriétés d'adsorption sélective de l'analyte à doser et de migration et de capillarité permettant à l'échantillon de se déplacer et d'entraîner l'analyte à doser à travers les zones réactives ; cette deuxième zone réactive peut être composée de deux parties distinctes et contigues ayant l'une des deux ou les deux propriétés énoncées ci-dessus.

Si la réactivité de la membrane de la deuxième zone peut être obtenue directement par ses propriétés intrinsèques, par exemple rapport hydrophobicité/hydrophilicité adéquat, la charge ionique ou la capacité d'absorption, ou après traitement approprié par des greffages de résidus ou des molécules telles

que citées plus haut, il sera cependant préféré pour un test simple d'utiliser dans la première zone un ligand marqué reconnaissant spécifiquement la partie protéique de la protéine glyquée ou glycosylée et dans la deuxième zone une résine d'échange d'ions, par exemple cationique, ou un support d'affinité comportant une lectine permettant de discriminer dans le premier couple d'affinité formé dans la première zone comprenant le ligand (A), celui qui comprendra la molécule de sucre, de le bloquer au niveau de cette deuxième zone d'affinité et, par une lecture directe et simple, d'en mesurer la présence et la quantité.

Le procédé de l'invention est caractérisé en ce que le flux de liquide à travers le dispositif est généré par un matériau hygroscopique (50), par exemple de la ouate de cellulose, des dérivés de cellulose, des polyesters de type nylon, des polymères fibreux ou microporeux du type polyester haute densité, ou toutes fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre comprimée ou de couches multiples et susceptibles de drainer par capillarité le liquide déposé dans le réservoir, jouant ainsi un rôle de buvard.

Cette zone buvard peut, en outre, être précédée en amont par une zone (40) de contrôle de bon fonctionnement de la réaction et éliminer toute réaction entre un anticorps monoclonal utilisé à titre de ligand avec des anticorps anti-anticorps de souris, de rat ou autre espèce qui auraient pu pré-exister dans l'échantillon à doser.

Cette zone (40) peut également contenir un témoin de bon fonctionnement de la réaction (42).

La présente invention est également relative à un dispositif (10) pour la détection et la détermination d'une protéine glyquée ou glycosylée présente dans un

échantillon et caractérisé en ce qu'il comprend au moins trois zones :

a) Une zone réservoir (20) contenant un ligand spécifique de la protéine glyquée, le cas échéant surmonté d'un moyen de filtration (25), cette zone réservoir (20) étant fixée sur une membrane (22) ayant la propriété de permettre la migration par capillarité,

b) Une zone réactive composée d'une membrane activée (30) présentant des propriétés d'adsorption sélective de la substance à doser et des propriétés de migration par capillarité, contigüe, ou superposée partiellement à la membrane (22), et constituée d'un matériau différent de la membrane (22),

c) Le cas échéant, une zone constituée d'une membrane (40) sur laquelle a été adsorbée une molécule biologique (42) permettant de vérifier le bon fonctionnement de la réaction,

d) Un moyen absorbant (50) permettant de favoriser le flux de liquide à travers les différentes zones décrites en a), b), c), et contigüe à la membrane activée (30) ou à la membrane (40) de la zone de bon fonctionnement, l'ensemble (12) comprenant la zone réservoir (20), le moyen de filtration (25), la membrane activée (30), la membrane (40) et le moyen absorbant (50) étant fixés sur un film de polyéthylène (60) de type "Mylar", l'ensemble (12) pouvant lui-même être positionné dans un boîtier (14) muni d'un réceptacle (16) permettant de recevoir 0,05 ml à 0,5 ml de liquide à tester, et de deux fenêtres, la première (17) laissant apparaître le résultat de la réaction et la deuxième (18) laissant apparaître le témoin de bon fonctionnement de la réaction.

La zone réservoir (20) contient un ligand (A) pouvant former une première paire d'affinité avec la substance à doser, le ligand étant modifié ou susceptible d'être modifié par un marqueur permettant



de le localiser seul ou inclus dans une première paire d'affinité, ce réservoir (20) étant superposé ou adjacent à une membrane (22) traitée de telle façon qu'elle présente de faibles capacités d'adsorption de molécules biologiques et de fortes propriétés de migration et de capillarité permettant à l'échantillon de se déplacer et d'entraîner la substance à doser à travers les zones réactives.

La deuxième zone réactive de l'ensemble (12) est composée d'une membrane activée (30) présentant des propriétés d'absorption sélective de la substance à doser (par exemple par interaction ionique, par interaction hydrophobe, par affinité, par immunoaffinité). Une propriété importante de cette deuxième zone est qu'elle peut être composée d'un matériau ou d'un mélange de plusieurs matériaux qui en tout état de cause sont différents de ceux du matériau de la première zone réactive. Dans cette deuxième zone d'affinité, le support lui-même est modifié de telle façon qu'il présente une affinité avec le couple d'affinité formé dans la première zone, et par conséquent cette deuxième zone sert en même temps de capture et d'arrêt de la migration de tous les complexes d'affinité formés contenant la molécule recherchée, à l'exclusion des complexes d'affinité formés n'ayant pas la molécule recherchée.

Il s'agit donc d'appliquer ici le principe de la chromatographie par interaction ou par affinité permettant ainsi de bloquer la substance recherchée.

Le dispositif comprend également un élément absorbant dont le rôle est de provoquer ou de favoriser le flux de liquide à travers les zones précédentes. Cet élément peut être composé d'un ou plusieurs matériaux ayant des propriétés hygroscopiques. Cet élément peut en outre et le cas échéant être précédé par une zone de contrôle de bon fonctionnement de la réaction : par

exemple si un anticorps antihémoglobine a été utilisé dans la première zone d'affinité, l'hémoglobine non glyquée pourra être utilisée dans la zone de contrôle afin d'éliminer des réactions non spécifiques qui auraient pu avoir lieu entre des substances présentes dans le liquide biologique et la membrane d'affinité (30). L'ensemble des éléments contigus ou partiellement superposés (20), (25), (30), (40) et (50) ou une partie de cet ensemble dépourvu des éléments (25) ou (40) ou les deux, est placé sur un support plastique (60), laissant apparaître des fenêtres. Ces trois parties peuvent également être placées de manière superposée ou en couches.

Le dispositif de l'invention décrit ci-dessus permet en un test simple, rapide en une seule étape de discriminer dans un liquide donné, une forme moléculaire dépourvue de sucre et une forme moléculaire ayant subi une glycation ou une glycosylation.

Le dispositif allie donc le principe de la chromatographie à celui de la chimie sèche ; en effet, le dispositif de l'invention comprend dans ses deux zones réactives, d'une part le ligand marqué de la protéine à rechercher, et d'autre part une membrane d'affinité ayant soit des propriétés intrinsèques permettant de capturer de façon spécifique le couple d'affinités ainsi marqué, par exemple une charge ionique, ou alors après traitement approprié portant des groupe greffés de type molécule ionisable par exemple  $R-NH_2$ ,  $R-OH$ ,  $R-COH$ ,  $R-SH$ , ou hydrophobe du type  $R-CH_3$ ,  $R$ -phényl ou des propriétés chimiques réactives de type époxy, aldéhyde, carboxyl, halogényl ou enfin des propriétés biochimiques ou immunologiques appropriées, par exemple anticorps, glycane, peptide ou tout type de molécule déjà cité plus haut présentant une affinité particulière avec l'analyte à doser.

Certains des éléments de ce dispositif sont préalablement traités afin, d'une part d'éliminer des liaisons non spécifiques entre la protéine à doser et les différents supports et d'autre part, assurer une longue conservation sans altération des différentes molécules biologiques immobilisées dans le dispositif. Le réservoir (20) est préalablement à son utilisation saturé par du tampon PBS additionné de sucrose 10 % et de lait demi-écrémé en poudre à 5 % ; après 15 minutes à température ambiante, le réservoir est séché à  $37^{\circ}\text{C} \pm 2$  pendant une heure. Les zones de migration, notamment les zones (25) et (40) sont en un matériau de type nitrocellulose qui ont une forte affinité pour les molécules biologiques ; cette forte affinité est utilisée notamment dans la zone (40) de test de bon fonctionnement de la réaction pour fixer la molécule permettant de vérifier ce bon fonctionnement, par exemple un anticorps anti-haptoglobine ou de l'hémoglobine dans le cas du test de l'hémoglobine glyquée. Puis après la fixation des molécules biologiques, les membranes sont saturées par une solution tamponnée contenant des protéines, notamment du lait écrémé en poudre.

L'ensemble comportant le ligand et éventuellement les molécules greffées est ensuite déshydraté par toute technique appropriée et notamment la lyophilisation, ce qui permet une conservation de plusieurs mois de ce dispositif prêt à l'emploi. L'addition au moment de l'emploi dans le réservoir (20) de l'échantillon liquide, par l'intermédiaire du réceptacle (16), conduit à une réhydratation immédiate du ligand et permet la migration par capillarité dirigée par l'absorbant (50) grâce à ces propriétés hygroscopiques.

Les différentes zones décrites ci-dessus dans le dispositif de l'invention sont placées sans discontinuité dans un module en matière plastique ou

boîtier (14) permettant à la fois une bonne préhension de ce dispositif et laissant apparaître les deux zones réactives, à savoir la zone de capture par l'intermédiaire d'une fenêtre (17) et la zone de contrôle (18).

La présente invention est également relative à l'utilisation d'un dispositif tel que décrit ci-dessus pour mesurer la quantité de substance glyquée ou glycosylée dans un échantillon contenant la même substance, soit à l'état glyqué soit à l'état glycosylé.

Une utilisation qui paraît tout à fait avantageuse compte tenu de l'état de la technique décrite plus haut, est un dosage de l'hémoglobine glyquée qui apparaît chez les patients diabétiques ; un tel dosage d'hémoglobine glyquée peut permettre à un médecin ou au patient lui-même de suivre son taux de glycémie soit en prévention soit en suivi de traitement médicamenteux.

Outre l'application au dosage de l'hémoglobine glyquée dans le suivi du diabète, tout type d'application peut être envisagé ; il peut s'agir notamment de vérifier l'état de glycosylation d'une molécule recombinante sécrétée dans une culture de cellules eucaryotes ; un tel suivi peut être particulièrement avantageux pour les scientifiques qui chercheraient à déterminer la meilleure cellule hôte pour exprimer une protéine recombinante en utilisant le critère de la qualité de la glycosylation.

L'originalité du type de dispositif et de procédé de mise en oeuvre décrit ci-dessus, est de comporter différents types de zones réactives juxtaposées ou superposées, dont certaines d'entre elles utilisent directement les propriétés de chromatographie d'affinités, ou par échange d'ions utilisées dans les méthodes de chromatographie classique, et ce combinées avec les réactions d'affinités classiques, dans une

phase mobile décrite dans le test de diagnostic rapide de l'état de la technique tel que mentionné plus haut.

Ce test de diagnostic permet en une seule étape, sans étape de lavage ni de révélation enzymatique, ni utilisation d'appareillages ou de connaissances techniques particulières, de doser la présence d'une protéine glyquée dans un échantillon. En effet, le manipulateur applique directement l'échantillon à doser sur le réservoir contenant le traceur spécifique de la protéine glyquée à doser, ainsi que les tampons destinés à favoriser la liaison entre la protéine glyquée à doser, et la membrane réactive. L'ensemble pénètre dans le dispositif grâce au réceptacle (16) et traverse les différentes zones réactives par capillarité grâce à l'action de la zone jouant le rôle d'absorbant. Si l'échantillon contient l'analyte à doser, celui-ci réagit avec le ligand marqué préalablement présent dans le réservoir (20) ; le complexe est ensuite entraîné par le flux capillaire de l'échantillon à travers la membrane jusqu'à la deuxième surface réactive où il est piégé grâce à la nature même de cette zone de réactivité. Si une coloration apparaît, le test est positif. Dans le cas contraire, l'échantillon ne contient pas l'analyte glyqué ou glycosylé recherché. Ce test est sensible, la deuxième zone réactive, également zone de capture, par sa nature même, conduit à un phénomène de concentration des réactifs sur la membrane ; il peut en outre être quantitatif grâce aux caractéristiques intrinsèques des réactifs : en effet, une coloration apparaît à partir d'une concentration prédéterminée de l'analyte à doser, liée à un équilibre entre le ligand et le marquage du ligand. Enfin, ce type de test présente un coût unitaire très faible. D'autres avantages et précisions apparaîtront à la lecture des exemples ci-après

concernant le dosage de l'hémoglobine glyquée et aux figures.

**Exemple 1 : Préparation d'un dispositif selon l'invention permettant de doser l'hémoglobine glyquée : technique par affinité.**

**I - PREPARATION DES REACTIFS**

**A - Préparation de la solution de traceur**

Le traceur pourra être composé, par exemple d'un anticorps polyclonal ou monoclonal couplé à des particules d'or colloïdal.

**a) Cas d'un anticorps polyclonal**

L'anticorps est dialysé contre une solution de borate de sodium à 2 mM tamponnée à pH 9, pendant deux heures et à température ambiante.

La concentration de la solution d'anticorps est ajustée à 0,1 mg/ml avec la solution de borate de sodium à 2 mM tamponnée à pH 9.

A 2 ml de la solution d'anticorps sont ajoutés 20 ml d'une suspension de microparticules d'or colloïdal dont le diamètre moyen est compris entre 10 et 30 nm.

Le mélange est mis sous agitation pendant cinq minutes à température ambiante.

Il est centrifugé à 15 000 g pendant trente minutes et à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 5 ml d'une solution de Tris à 20 mM tamponnée à 7,4 et contenant 1% de sérum-albumine bovine, 0,1% de Tween 20 et 0,5% de polyéthylène glycol 3000.

Le mélange réactionnel est à nouveau centrifugé deux fois dans les mêmes conditions.

A l'issue de la troisième centrifugation, le culot est repris dans 1 ml d'une solution de Tris à 20 mM tamponnée à 7,4 et contenant 1% de sérum-albumine bovine, 0,1% de Tween et 0,5% de polyéthylène glycol 3000.

La densité optique de la solution est mesurée à 595 nm.

La solution de traceur ainsi obtenue est stable six mois à 4°C.

b) Cas d'un anticorps monoclonal

Le point isoélectrique de l'anticorps considéré est préalablement déterminé par électrophorèse en isoélectrofocalisation (IEF).

L'anticorps est dialysé contre une solution de borate de sodium à 2 mM tamponnée à un pH supérieur de 0,5 unité au point isoélectrique de l'anticorps considéré, pendant deux heures et à température ambiante.

La suite du protocole est rigoureusement identique à ce qui a été énoncé plus haut concernant un anticorps polyclonal.

c) Cas particulier de l'haptoglobine

Le protocole adopté sera celui concernant les anticorps polyclonaux.

**B - Préparation de la première zone réactive**

La première zone réactive ou "réservoir" (20) est préparée par imprégnation de la phase solide par un tampon permettant de placer l'échantillon à doser dans des conditions idéales de pH et de force ionique. Ce tampon sera choisi en fonction de la nature de la seconde zone réactive ou "support de la réaction" (30).

Nous pouvons citer à titre d'exemple, dans le cas où le support de la réaction serait une membrane de nitrocellulose activée par l'acide aminophénylboronique, un tampon à base d'acétate d'ammonium.

Une feuille de ouate de cellulose est immergée dans une solution d'acétate d'ammonium à 30 mM tamponnée à pH 8,2 pendant quinze minutes à température ambiante et sous légère agitation.

La feuille est mise à sécher dans une étuve à 37°C pendant trois heures.

Si son utilisation n'est pas immédiate, la feuille peut être stockée sous vide, en présence de dessicant et à température ambiante. Dans ces conditions, elle est stable un an.

Sinon, la feuille est découpée aux dimensions voulues et le traceur y est déposé à raison de 20  $\mu$ l d'une solution de densité optique à 595 nm comprise entre dix et quinze unités d'absorption (UA).

Les réservoirs ainsi obtenus sont séchés dans une étuve à 37°C pendant trois heures.

Si leur utilisation n'est pas immédiate, les réservoirs peuvent être stockés sous vide, en présence de dessicant et à température ambiante. Dans ces conditions, ils sont stables un an.

#### **C - Préparation de la deuxième zone réactive**

La deuxième zone réactive ou "support de la réaction" est constituée, par exemple d'une membrane de nitrocellulose activée chimiquement par l'acide aminophénylboronique.

La membrane est immergée dans une solution d'acétate d'ammonium à 30 mM tamponnée à pH 8,2, pendant quinze minutes à température ambiante et sous légère agitation.

La membrane est mise à sécher dans une étuve.

La membrane est découpée aux dimensions voulues.

Si son utilisation n'est pas immédiate, la membrane peut être stockée sous vide, en présence de dessicant et à température ambiante. Dans ces conditions, elle est stable un an.

#### **II - MONTAGE DU DISPOSITIF**

Les zones réactives ainsi obtenues et découpées aux dimensions voulues sont lyophilisées et assemblées de manière jointive dans un module en matière plastique (14). Les dispositifs obtenus sont emballés sous vide



en présence d'un dessiccant. Dans ces conditions, ils sont stables un an à température ambiante.

**Exemple 2 : Préparation d'un dispositif de dosage de l'hémoglobine glyquée : technique par échange d'ions.**

**I - PREPARATION DES REACTIFS**

**A - Préparation de la solution de traceur**

Le protocole est identique à celui de l'exemple 1.

**B - Préparation de la première zone réactive**

Dans le cas de la mise en oeuvre de la technique par échange d'ions, nous pouvons citer à titre d'exemple, si le support de la réaction est de nature échangeur de cations (par exemple, les membranes Sartobind<sup>R</sup> S de Sartorius), un tampon à base de malonate de sodium.

Une feuille de ouate de cellulose est immergée dans une solution de malonate de sodium à 25 mM tamponnée à pH 5,7 pendant quinze minutes à température ambiante et sous légère agitation.

La feuille est mise à sécher dans une étuve à 37°C pendant trois heures.

Si son utilisation n'est pas immédiate, la feuille peut être stockée sous vide, en présence de dessiccant et à température ambiante. Dans ces conditions, elle est stable un an.

Sinon, la feuille est découpée aux dimensions voulues et le traceur y est déposé à raison de 20  $\mu$ l d'une solution de densité optique à 595 nm comprise entre dix et quinze unités d'absorption (UA).

Les réservoirs ainsi obtenus sont séchés dans une étuve à 37°C pendant trois heures.

Si leur utilisation n'est pas immédiate, les réservoirs peuvent être stockés sous vide, en présence de dessiccant et à température ambiante. Dans ces conditions, ils sont stables un an.

**C - Préparation de la deuxième zone réactive**

La deuxième zone réactive ou "support de la réaction" est constituée, par exemple, d'une membrane échangeuse de cations de type Sartobind<sup>R</sup> S.

La membrane est immergée dans une solution de malonate de sodium à 25 mM tamponnée à pH 5,7, pendant quinze minutes à température ambiante et sous légère agitation. La membrane est mise à sécher dans une étuve à 37°C pendant trois heures.

La membrane est découpée aux dimensions voulues.

Si son utilisation n'est pas immédiate, la membrane peut être stockée sous vide, en présence de dessicant et à température ambiante. Dans ces conditions, elle est stable un an.

#### **D - Préparation de la troisième zone réactive**

Le protocole est identique à celui de l'exemple 1.

#### **II - MONTAGE DU DISPOSITIF**

Les trois zones réactives ainsi obtenues et découpées aux dimensions voulues sont lyophilisées et assemblées de manière jointive dans un module en matière plastique (14). Les tests obtenus sont emballés sous vide en présence d'un dessicant. Dans ces conditions, ils sont stables un an à température ambiante.

#### **Exemple 3 : Réalisation d'un diagnostic**

L'utilisateur du dispositif de l'invention pourra déposer dans le réceptacle (16) 50 µl de sang total et 150 µl de tampon de migration dans le réceptacle (16) prévu à cet effet. Si la substance recherchée est dans l'urine, l'utilisateur déposera alors dans le réceptacle (16) prévu à cet effet 150 µl d'urine.

Sachant que dans le réservoir (20), au moins 0,5 µg de protéine marquée à l'or colloïdal ont été préalablement fixés, l'utilisateur du test pourra après dépôt de son échantillon observer la présence ou l'absence d'une bande violette dans la fenêtre de lecture (16), la présence ou l'absence de cette bande

étant le reflet direct de la présence ou de l'absence d'hémoglobine glyquée recherchée dans l'échantillon. La présence d'une deuxième bande violette dans la fenêtre de contrôle du bon fonctionnement de la réaction (18) est nécessaire à l'interprétation de la lecture de la présence d'une bande dans la fenêtre de lecture du test (17).

L'homme du métier saura en faisant bon usage de la combinaison de ces différentes zones, adapter le dispositif de l'invention à la protéine glyquée ou glycosilée qu'il souhaite rechercher et également à la dose minimum de ce type de protéine qu'il souhaite détecter.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ZIEL F.H., J. Clin. Endocr. Metab., 64, 269-273, (1986).
2. FERRELL R. E., Am. J. Epidemiol., 119, 159-166, (1984).
3. NATHAN D. M., N. Engl. J. Med., 310, 341-346, (1984).
4. MACDONALD J. M., Hum. Pathol., 10, 279-291, (1979).
5. GOLDSTEIN D. E., Diabetes, 31, 70-78, (1982).
6. NATHAN D. M., Clin. Diabetes, 1, 1-7, (1983).
7. KILZER P., Clin. Chem., 31, 1060-1067, (1985).
8. UNGER R. H., Diabetes, 31, 479-483, (1982).
9. JOUANOVIC L., Am. J. Med., 68, 105-112, (1980).
10. TRIVELLI L. A., NHIM, 284, 353-357, (1971).
11. KRISHNAMOORTHY R., Clin. Chim. Acta, 69, 203-209, (1976).
12. JEPPSON J. o., Electrophoresis, 82, 633-639, (1983).
13. LAAST., Anal. Biochem., 114 167-172, (1981).
14. CASTAGNOLA M., Clin. Biochem., 18, 327-331, (1985).
15. FLUCKIGER R., FEBS Letter, 71, 356-360, (1976).
16. PECORARO R. E., Diabetes, 28, 112-125 (1979).
17. PARKER K. M., Clin. Chem., 27, 669-672, (1981).
18. DOLHOFFER R., Clin. Chim Acta, 112, 197-204, (1981).
19. CASTAGNOLA M., J. Lab. Med., XII, 183-189, (1985).
20. COLE R. A., Metabolism, 27, 289-301, (1978).
21. GOLDSTEIN D. E., Diabetes Care, 3, 503-507, (1980).
22. DAVIS J. E., Diabetes, 27, 102-107, (1981).
23. NAKAYAMA H., J. Im. Meth., 99, 95-100, (1987).
24. ENGBAEK F., Clin. Chem., 35, 93-97, (1989).
25. SVENDSEN P. A., Diabetologia, 19, 130-136, (1980).
26. WIDNESS J. A., J. Lab. Clin. Med., 95, 286-294, (1980).
27. GOLDSTEIN D. E., Diabetes, 31, 623-628, (1980).
28. BOLLI G., Diabetologia, 21, 70-72, (1981).
29. NATHAN D. M., Clin. Chem., 28, 512-515, (1982).

30. BISSE E., Diabetes, 31, 630-633, (1982).
31. ROSENTHAL M. A., Hemoglobin, 3, 215-217, (1979).
32. YATSCOFF R. W., Clin. Chem., 29, 543-545, (1983).
33. KRAUSE J. R., Am. J. Clin. Path., 78, 677-679, (1982).
34. ALEYASSINE H., Clin. Chem., 26, 536-527, (1980).
35. BROWNLEE M., Diabetes, 29, 1044-1047, (1980).
36. MALLIA A. K., Anal. Letters, 14, 649-661, (1981).
37. SHAPRIO R., J. Biol. Chem., 255, 3120-3127, (1980).
38. KLENK D. C., Clin. Chem., 28, 2088-2094, (1982).
39. FAIRBANKS V. F., Mayo Chim. Proc., 58, 770-773, (1983).
40. ABRAHAM E. C., J. Lab. Clin. Med., 102, 187-197, (1983).
41. HEROLD D. A., Am. Clin. Lab. Sci., 13, 482-488, (1983).
42. SCOTT M. G., Clin. Chem., 30, 896-898, (1984).
43. FORREST R. D., Clin. Chem., 34, 145-148, (1988).

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination et de dosage de la quantité d'une substance glyquée ou glycosylée présente dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) Appliquer ledit échantillon dans le réceptacle (16) d'un boîtier plastique, ledit réceptacle (16) étant à l'aplomb à une zone constituée le cas échéant d'un filtre (25), d'un réservoir (20) contenant un ligand (A) marqué, cette zone réservoir (20) étant contigüe à une membrane (22) ayant la propriété de permettre la migration par capillarité des solutions contenant les molécules à doser et les paires d'affinités éventuellement formées dans la zone réservoir et d'avoir une faible affinité pour les molécules biologiques,

b) Laisser l'échantillon migrer par capillarité à travers cette première zone jusqu'à une deuxième zone de capture constituée d'un support d'affinité activé (30) susceptible de retenir spécifiquement la molécule glyquée ou glycosylée recherchée, ledit support étant de nature différente de la membrane (22),

c) Laisser l'échantillon migrer par capillarité vers une troisième zone garante (40) de bon fonctionnement de la réaction, ladite zone étant imprégnée au niveau d'une bande (42) d'un ligand spécifique (B) du premier ligand (A),

d) Lire une réponse par la présence ou l'absence d'une bande (31) au niveau d'une première fenêtre de lecture (17) laissant apparaître la zone (30) et le bon fonctionnement de la réaction par observation d'une bande (42) à travers une deuxième fenêtre de lecture (18),

e) Le flux de liquide entre le dépôt dans le réceptacle (16) et la lecture du résultat de la réaction étant réalisé par l'existence d'un moyen absorbant (50) possédant des propriétés hygroscopiques importantes, contigu à la membrane (40).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réservoir (20) est constitué d'un matériau choisi parmi la fibre de verre, la cellulose, les dérivés de cellulose, le nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le réservoir (20) est constitué d'une feuille de ouate de cellulose.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand (A) est un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de la substance glyquée.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ligand (A) est l'haptoglobine.

6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que le ligand (A) est couplé à des particules colloïdales contenant un métal, notamment de l'or.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que le ligand est couplé à un marqueur organo-métallique.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support d'affinité (30) est une membrane échangeuse d'ions, notamment échangeuse de cations.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support d'affinité (30) est une membrane de nitrocellulose activée, notamment par l'acide aminé phénylboronique.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réactivité sélective du support d'affinité (30) est obtenue, soit :

- par greffage de résidus ou de molécules ionisables tels les résidus  $R-NH_2$ ,  $R-OH$ ,  $R-COH$ ,  $R-SH$ ,
- par greffage de résidus possédant des propriétés hydrophobes tels des chaînes polycarbonnées, des résidus de type  $R-CH_3$ ,  $R$ -phényl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés réactives tels des résidus époxy, aldehyde, carboxyl, halogenyl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés biochimiques ou immunologiques appropriées tels un glycane, une lectine, un substrat ou inhibiteur enzymatique, un élément du couple avidine-biotine, un élément du couple hémoglobine-haptoglobine, ou toute molécule présentant une affinité particulière avec l'analyte à doser.

11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le support d'affinité (30) est contigu à une zone de contrôle de bon fonctionnement de la réaction (40) constituée d'une membrane préalablement imprégnée d'un ligand (B) spécifique du premier ligand (A) au niveau d'une bande (42).

12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la zone constituée d'un matériau hygroscopique, notamment la ouate de cellulose ou des dérivés de cellulose, de nylon, d'un polymère fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la lecture de la réaction est effectuée par moyen optique dans la lumière visible ou dans l'infrarouge.



14. Dispositif (10) pour la détection et la détermination d'une protéine glyquée ou glycosylée présente dans un échantillon caractérisé en ce qu'il comprend au moins trois zones dont deux zones réactives :

a) Une zone réservoir (20) contenant un ligand spécifique de la protéine glyquée, le cas échéant surmonté d'un moyen de filtration (25), cette zone réservoir (20) étant fixée sur une membrane (22) ayant la propriété de permettre la migration par capillarité,

b) Une zone réactive composée d'une membrane activée (30) présentant des propriétés d'adsorption sélective de la substance à doser et des propriétés de migration par capillarité, contigüe, ou superposée partiellement à la membrane (22), et constitué d'un matériau différent de la membrane (22),

c) Le cas échéant une zone constituée d'une membrane (40) sur laquelle a été adsorbée une molécule biologique (42) permettant de vérifier le bon fonctionnement de la réaction,

d) Un moyen absorbant (50) permettant de favoriser le flux de liquide à travers les différentes zones décrites en a), b), c), et contigüe à la membrane activée (30) ou à la membrane (40) de la zone de bon fonctionnement, l'ensemble (12) comprenant la zone réservoir (20), le moyen de filtration (25), la membrane activée (30), la membrane (40) et le moyen absorbant (50) étant fixés sur un film de polyéthylène (60) de type "Mylar" <sup>R</sup>, l'ensemble (12) pouvant lui-même être positionné dans un boîtier (14) muni d'un réceptacle (16) permettant de recevoir 0,05 ml à 0,5 ml de liquide à tester, et de deux fenêtres, la première (17) laissant apparaître le résultat de la réaction et la deuxième (18) laissant apparaître le témoin de bon fonctionnement de la réaction.

15. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que le réservoir (20) est constituée d'un matériau choisi parmi la fibre de verre, la cellulose, les dérivés de cellulose, le nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples, et le réservoir est constitué d'une feuille de ouate de cellulose.

16. Dispositif selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisé en ce que avant usage, l'ensemble des éléments qui lui sont constitutifs sont déshydratés.

17. Dispositif selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que le ligand de la première zone réactive est choisie parmi les molécules présentant une affinité particulière pour la substance glyquée à doser, notamment les anticorps monoclonaux ou polyclonaux, l'haptoglobine, les lectines.

18. Dispositif selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que le ligand (A) est couplé à des particules colloïdales contenant un métal, notamment de l'or.

19. Dispositif selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que le ligand est couplé à un marqueur organo-métallique.

20. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que la zone réactive (30) est une membrane échangeuse d'ions, notamment échangeuse de cations.

21. Dispositif selon la revendication 14, la zone réactive (30) est une membrane de nitrocellulose activée, notamment par l'acide aminé phénylboronique.

22. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que la réactivité sélective de la zone réactive (30) est obtenue soit :

- par greffage de résidus ou de molécules ionisables tels les résidus R-NH<sub>2</sub>, R-OH, R-COH, R-SH,
- par greffage de résidus possédant des propriétés hydrophobes tels des chaînes polycarbonées, des résidus de type R-CH<sub>3</sub>, R-phényl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés réactives tels des résidus époxy, aldehyde, carboxyl, halogenyl,
- par greffage de résidus ayant des propriétés biochimiques ou immunologiques appropriées tels un glycane, une lectine, un substrat ou inhibiteur enzymatique, un élément du couple avidine-biotine, un élément du couple hémoglobine-haptoglobine, ou toute molécule présentant une affinité particulière avec l'analyte à doser.

23. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que la zone buvard est constituée d'un matériau hygroscopique, notamment la ouate de cellulose ou des dérivés de cellulose, de nylon, d'un polymère fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique, sous forme de poudre, de comprimés ou de couches multiples.

24. Dispositif selon l'une des revendications 14 à 23, caractérisé en ce que les différentes zones réactives sont placées sans discontinuité dans un module en matière plastique laissant apparaître les deux zones (30) et (40) réactives par l'intermédiaire de fenêtres (17) et (18).

25. Utilisation d'un dispositif selon l'une des revendications 14 à 24 pour mesurer la quantité de substance glyquée ou glycosylée dans un échantillon contenant la même substance à l'état non glyquée ou glycosylée.

26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que la substance est l'hémoglobine

glyquée et que l'utilisation en est le suivi de la glycémie chez les sujets diabétiques.

27. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que la substance est une protéine glycosylée sécrétée par un hôte cellulaire recombinant contenant le gène de la protéine comme gène hétérologue.

1 / 1

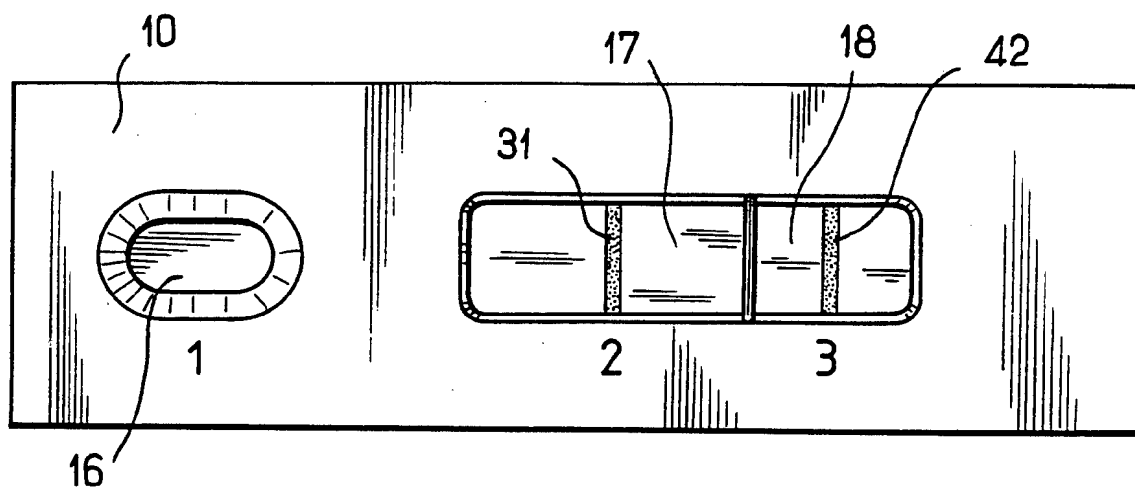


FIG. 1a

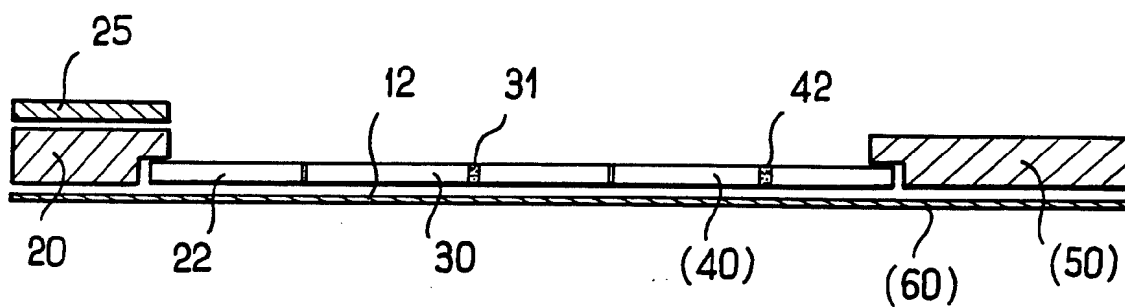


FIG. 1b

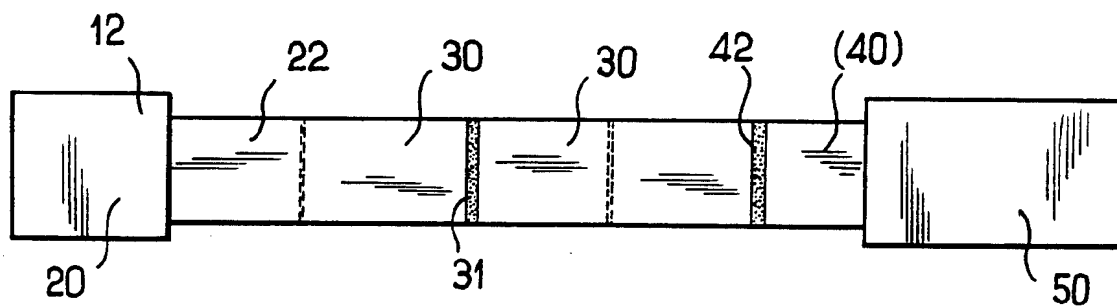


FIG. 1c

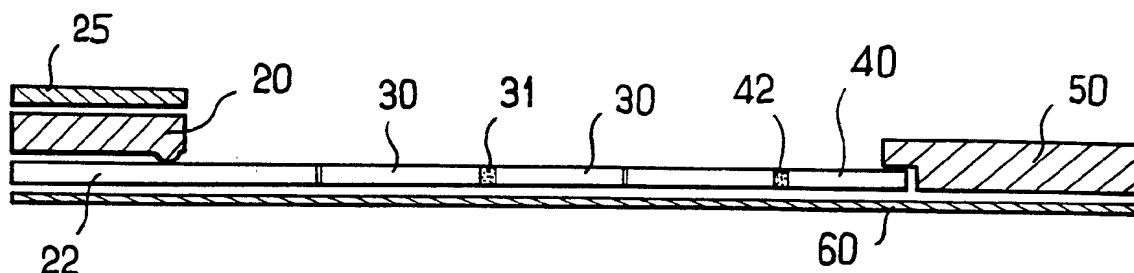


FIG. 1d

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00776

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/558 G01N33/72 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 560 411 (UNILEVER N.V.) 15 September 1993 cited in the application see the whole document ---	1-27
Y	EP,A,0 582 231 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 9 February 1994 see the whole document ---	1-27
Y	EP,A,0 512 390 (FUJIREBIO INC.) 11 November 1992 see the whole document ---	1-27
Y	EP,A,0 520 202 (DRÄGERWERK AG.) 30 December 1992 see the whole document ---	1-27
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 September 1995

Date of mailing of the international search report

11. 10. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/00776

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 559 164 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 8 September 1993 see claims; figures ---	1-27
Y	EP,A,0 573 972 (FUJIREBIO INC.) 15 December 1993 see abstract; claims -----	1-27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-560411	15-09-93	AU-B- 626207	23-07-92
		AU-B- 1622888	02-12-88
		AU-B- 8048994	09-03-95
		AU-B- 8049094	09-03-95
		DE-D- 3887771	24-03-94
		DE-T- 3887771	26-05-94
		DE-U- 8805565	18-08-88
		EP-A- 0291194	17-11-88
		EP-A- 0560410	15-09-93
		ES-T- 2050704	01-06-94
		FR-A- 2614423	28-10-88
		WO-A- 8808534	03-11-88
		GB-A- 2204398	09-11-88
		JP-A- 6180320	28-06-94
		JP-A- 6160388	07-06-94
		JP-B- 7046107	17-05-95
		JP-T- 1503174	26-10-89
		AU-B- 656966	23-02-95
		AU-B- 1704992	27-08-92
		AU-B- 656967	23-02-95
		AU-B- 1705092	27-08-92
EP-A-582231	09-02-94	AU-B- 4427493	10-02-94
		CA-A- 2101472	04-02-94
		DK-A- 88293	04-02-94
		FI-A- 933434	04-02-94
		JP-A- 6167497	14-06-94
EP-A-512390	11-11-92	JP-A- 5126832	21-05-93
		AU-B- 660972	13-07-95
		AU-B- 1595592	05-11-92
		JP-A- 5149951	15-06-93
EP-A-520202	30-12-92	DE-A- 4121493	07-01-93
EP-A-559164	08-09-93	DE-A- 4206932	09-09-93
		AU-B- 3387193	16-09-93
		CN-A- 1081765	09-02-94
		CZ-A- 9300291	19-01-94
		JP-A- 6011510	21-01-94



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-559164		NZ-A- 247054	24-02-95
		SI-A- 9300108	30-09-93
-----			
EP-A-573972	15-12-93	JP-A- 6066796	11-03-94
		JP-A- 6066795	11-03-94
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/FR 95/00776

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 G01N33/558 G01N33/72 G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 560 411 (UNILEVER N.V.) 15 Septembre 1993 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-27
Y	EP,A,0 582 231 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 9 Février 1994 voir le document en entier ---	1-27
Y	EP,A,0 512 390 (FUJIREBIO INC.) 11 Novembre 1992 voir le document en entier ---	1-27
Y	EP,A,0 520 202 (DRÄGERWERK AG.) 30 Décembre 1992 voir le document en entier ---	1-27
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Septembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11. 10. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No  
PCT/FR 95/00776

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 559 164 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 8 Septembre 1993 voir revendications; figures ---	1-27
Y	EP,A,0 573 972 (FUJIREBIO INC.) 15 Décembre 1993 voir abrégé; revendications -----	1-27

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Derr Internationale No  
PCT/FR 95/00776

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-560411	15-09-93	AU-B- 626207	23-07-92
		AU-B- 1622888	02-12-88
		AU-B- 8048994	09-03-95
		AU-B- 8049094	09-03-95
		DE-D- 3887771	24-03-94
		DE-T- 3887771	26-05-94
		DE-U- 8805565	18-08-88
		EP-A- 0291194	17-11-88
		EP-A- 0560410	15-09-93
		ES-T- 2050704	01-06-94
		FR-A- 2614423	28-10-88
		WO-A- 8808534	03-11-88
		GB-A- 2204398	09-11-88
		JP-A- 6180320	28-06-94
		JP-A- 6160388	07-06-94
		JP-B- 7046107	17-05-95
		JP-T- 1503174	26-10-89
		AU-B- 656966	23-02-95
		AU-B- 1704992	27-08-92
		AU-B- 656967	23-02-95
		AU-B- 1705092	27-08-92
EP-A-582231	09-02-94	AU-B- 4427493	10-02-94
		CA-A- 2101472	04-02-94
		DK-A- 88293	04-02-94
		FI-A- 933434	04-02-94
		JP-A- 6167497	14-06-94
EP-A-512390	11-11-92	JP-A- 5126832	21-05-93
		AU-B- 660972	13-07-95
		AU-B- 1595592	05-11-92
		JP-A- 5149951	15-06-93
EP-A-520202	30-12-92	DE-A- 4121493	07-01-93
EP-A-559164	08-09-93	DE-A- 4206932	09-09-93
		AU-B- 3387193	16-09-93
		CN-A- 1081765	09-02-94
		CZ-A- 9300291	19-01-94
		JP-A- 6011510	21-01-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den Internationale No  
PCT/FR 95/00776

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-559164		NZ-A- 247054	24-02-95
		SI-A- 9300108	30-09-93
-----			
EP-A-573972	15-12-93	JP-A- 6066796	11-03-94
		JP-A- 6066795	11-03-94
-----			